

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 818 287**

②① N° d'enregistrement national : **00 16314**

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : C 12 Q 1/68, C 04 B 35/495, 35/48, 35/46, 41/80

①②

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②② Date de dépôt : 14.12.00.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 21.06.02 Bulletin 02/25.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-  
MIQUE Etablissement de caractère scientifique techni-  
que et industriel — FR.

⑦② Inventeur(s) : VINET FRANCOISE, CHATON  
PATRICK, MITTLER FREDERIQUE et BARRITAU  
PIERRE.

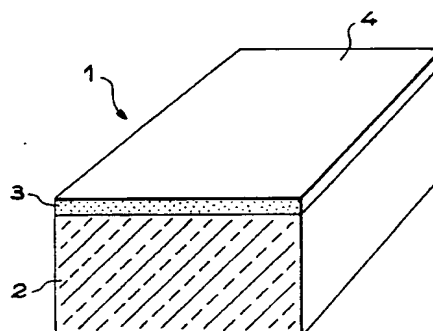
⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BREVATOME.

⑤④ SUPPORT SOLIDE POUR L'IMMOBILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES.

⑤⑦ L'invention concerne un support solide (1) présentant  
une surface (4) pour l'immobilisation d'oligonucléotides, ca-  
ractérisé en ce que ladite surface (4) est la surface d'un ma-  
tériel (3) choisi parmi  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$  et un  
mélange comprenant au moins l'un de ces matériaux, ladite  
surface (4) ayant subi un traitement pour la rendre hydrophi-  
le.

Application à la fabrication de biopuces.



FR 2 818 287 - A1



**SUPPORT SOLIDE POUR L'IMMOBILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES****DESCRIPTION****Domaine technique**

5 L'invention concerne un support solide pour l'immobilisation d'oligonucléotides. Elle concerne aussi un procédé de réalisation d'un tel support solide.

10 Le support solide de l'invention est notamment utilisable pour réaliser des dispositifs d'analyse biologique miniaturisés ou biopuces. Ces biopuces selon l'invention peuvent être utilisées par exemple pour le séquençage, pour le criblage (ou "screening" en anglais) du polymorphisme simple de  
15 nucléotide (SNP), l'étude de l'expression des gènes, l'identification de microorganismes, l'étude du transcriptome...

**Etat de la technique antérieure**

20 Les biopuces mettent en œuvre une technique de greffage d'oligonucléotides sur un support solide. Ces oligonucléotides peuvent être obtenus par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui fournit des fragments d'ADN de quelques centaines de bases. Ils peuvent être présynthétisés, auquel cas ils comportent  
25 entre 6 et 100 mères, ou synthétisés in situ auquel cas ils comportent entre 6 et 60 mères.

La fabrication et l'utilisation de microréseaux (ou "microarrays" en anglais) contenant des sondes biologiques relèvent d'un domaine qui se  
30 développe rapidement. Les microréseaux peuvent être

fabriqués par synthèse parallèle directement sur un support solide. Ils conduisent dans ce cas à des biopuces de haute densité (plus de 5000 sondes). Les microréseaux peuvent aussi être fabriqués par

5 immobilisation de sondes sur la surface du support solide d'une biopuce. Cette dernière méthode est plus versatile puisqu'elle permet à la fois l'utilisation de produits naturels ou synthétiques qui peuvent être purifiés avant l'immobilisation.

10 Les supports solides sur lesquels les molécules biologiques sont généralement déposées sont des supports en verre, en silicium, en gel de polyacrylamide, en polymère (voir le brevet américain N° 5 919 523), en plastique (plaques micropuits). Il

15 peut s'agir de membranes en nylon.

Différentes techniques sont utilisables pour déposer les composés biologiques sur les supports en des sites déterminés. Le pipetage permet le dépôt de microgouttes sur les sites : par jet d'encre,

20 piézoélectrique ou par la méthode dite "pin and ring".

Quelle que soit la méthode de dépôt, le support solide doit être traité pour fournir des surfaces d'accrochage ou de greffage pour les molécules biologiques. Ce traitement de surface assure la

25 formation de fonctions chimiques qui sont généralement des fonctions hydroxyles. Ces fonctions permettent d'assurer les étapes chimiques ultérieures de greffage. De plus, la densité des sites disponibles à cette étape va déterminer la densité finale de sondes biologiques

30 sur le support.

Pour des supports en verre ou en silicium recouvert d'une couche d'oxyde, un nettoyage chimique de la surface permet de lui conférer des groupements hydroxyles, des molécules  $\text{SiO}_2$  de surface donnant du  $\text{SiOH}$ . Le nettoyage peut être réalisé sous des conditions basiques (au moyen de soude ou d'ammoniaque) ou sous des conditions acides (au moyen d'acide chlorhydrique, d'acide sulfochromique ou d'acide sulfo-oxygéné). Des mesures faites par la méthode d'angle de goutte permettent de caractériser l'efficacité de la transformation de l'état de surface du support. L'efficacité du traitement sur l'immobilisation des sondes est caractérisée par hybridation avec des cibles complémentaires. Les observations de fluorescence montrent que, plus la surface du support est hydrophile, meilleure est l'immobilisation des sondes, ce qui permet l'obtention d'une plus grande densité de sondes sur le support.

Cependant, les supports solides de l'art connu présentent une homogénéité de surface pour la fixation des oligonucléotides qui n'est généralement pas assez satisfaisante.

#### **Exposé de l'invention**

La présente invention permet de remédier à ce problème de manque d'homogénéité pour la fixation des oligonucléotides.

Un premier objet de l'invention consiste en un support solide présentant une surface pour l'immobilisation d'oligonucléotides, caractérisé en ce que ladite surface est la surface d'un matériau choisi parmi  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$  et un mélange comprenant au

moins l'un de ces matériaux, ladite surface ayant subi un traitement pour la rendre hydrophile.

Avantageusement, le matériau se présente sous la forme d'une couche déposée sur un substrat.

5 Cette couche peut posséder une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et un micromètre. Le substrat peut être un substrat choisi parmi les substrats en verre, en plastique et en semiconducteur, par exemple en silicium.

10 Le matériau présentant cette surface d'immobilisation d'oligonucléotides peut être un mélange comprenant  $\text{SiO}_2$ .

Un deuxième objet de l'invention consiste en une biopuce comprenant un support solide pour  
15 l'immobilisation d'oligonucléotides tel que défini ci-dessus.

Un troisième objet de l'invention consiste en un procédé de réalisation d'un support solide présentant une surface pour l'immobilisation  
20 d'oligonucléotides, le support comprenant un substrat supportant une couche de matériau dont la face libre constitue ladite surface, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- fourniture dudit substrat,
- 25 - dépôt sur le substrat d'une couche d'un matériau choisi parmi  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$  et un mélange comprenant au moins l'un de ces matériaux,
- traitement de la face libre de ladite couche pour la rendre hydrophile.

L'étape de dépôt peut consister à déposer une couche de matériau d'une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et un micromètre.

5 L'étape de fourniture du substrat peut consister à fournir un substrat choisi parmi les substrats en verre, en plastique et en semiconducteur.

L'étape de dépôt peut consister à déposer un matériau comprenant  $\text{SiO}_2$ .

10 L'étape de dépôt peut mettre en œuvre une méthode de dépôt choisie parmi l'évaporation sous vide, la pulvérisation par faisceau d'ions, la pulvérisation radio-fréquence, la pulvérisation magnétron, le dépôt en phase vapeur de couches atomiques (ALCVD) et le dépôt sol-gel.

15 L'étape de traitement de la face libre de la couche déposée peut consister à nettoyer la couche par une solution basique ou par une solution acide.

20 Le procédé peut comporter une étape supplémentaire consistant à structurer la face libre de ladite couche. Cette étape de structuration peut mettre en œuvre une technique choisie parmi la gravure sèche, la gravure humide et le "lift-off".

#### **Brève description du dessin**

25 L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple non limitatif, accompagnée du dessin annexé qui est vue en perspective d'un support solide  
30 présentant une surface pour l'immobilisation d'oligonucléotides, selon l'invention.

### Description détaillée d'un mode de réalisation de l'invention

La figure annexée est une vue en perspective d'un support solide 1 selon l'invention. Le support solide 1 comprend un substrat 2 en un matériau permettant le dépôt d'une couche dont la face libre est destinée à constituer une surface pour l'immobilisation d'oligonucléotides. Le substrat 2 est par exemple en silicium.

Une couche 3 est déposée sur le substrat 2. Elle sert de précurseur d'accrochage pour les oligonucléotides. Elle est constituée, en partie ou en totalité, d'un oxyde (ou de plusieurs oxydes) de métal réfractaire  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$  ou  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ . La couche déposée est une couche mince d'épaisseur comprise entre quelques nm et 1  $\mu\text{m}$ . Cette couche peut être déposée par évaporation sous vide par canons à électrons à une température comprise entre 50 et 200°C environ. Elle peut être également déposée par pulvérisation par faisceau d'ions (IBS), par pulvérisation radio-fréquence ou magnétron. On peut citer également une technique récente de dépôt : le dépôt en phase vapeur de couches atomiques (ALCVD). On peut citer aussi le dépôt sol-gel.

Les matériaux pouvant constituer la couche mince selon l'invention peuvent être déposés, par les techniques d'évaporation PVD (canons à électrons, IBS, pulvérisation...), indifféremment sur du verre, du plastique, du silicium.

Les oxydes de ces métaux sont très stables vis-à-vis de solutions basiques, ce qui permet une transformation lente et uniforme de la surface.

Sans aucun traitement de surface, ces  
5 matériaux sont hydrophobes. Dans le cas de l'oxyde d'hafnium, la mesure d'angle de goutte d'eau conduit à une valeur de  $60^\circ$ . Selon le traitement basique effectué, l'angle de goutte varie de  $35^\circ$  à  $6^\circ$ .

Des supports ainsi traités ont été utilisés  
10 pour faire croître des oligonucléotides par synthèse in situ sur un support constitué d'une couche de  $\text{HfO}_2$  sur un substrat en silicium. Pour un échantillon de faible hydrophilie ( $35^\circ$ ), le signal de fluorescence, après hybridation de sondes de 20 mères par des cibles  
15 complémentaires, est faible et non uniforme. Un échantillon fortement hydrophile ( $6^\circ$ ) présente une nette amélioration, principalement en terme d'uniformité.

L'uniformité obtenue a été comparée à celle  
20 d'un support solide couramment utilisé à savoir un support formé d'un substrat en silicium recouvert d'une couche d'oxyde thermique de  $0,5 \mu\text{m}$  d'épaisseur. Par rapport à ce support solide de l'art connu, le support selon l'invention ( $\text{HfO}_2$  sur Si) procure une  
25 amélioration de l'uniformité du signal de fluorescence.

Le même résultat a été obtenu avec un substrat en verre recouvert d'une couche de  $\text{HfO}_2$  après immobilisation par liaison covalente de sondes de 20 mères présynthétisées.



Ce type de dépôt peut aussi être utilisé pour des biopuces employant la méthode d'immobilisation de sondes par interactions électrostatiques.

5 Le dépôt de ces oxydes de métaux réfractaires permet tous les types de greffage utilisés dans les technologies des biopuces, à savoir tout support (verre, silicium, plastique) et tout type de technique de greffage biologique (synthèse in situ, immobilisation par liaison covalente ou liaisons  
10 électrostatiques).

Les résultats des mesures montrent une amélioration de l'uniformité des signaux de fluorescence par rapport à l'état de l'art.

**REVENDICATIONS**

1. Support solide (1) présentant une surface (4) pour l'immobilisation d'oligonucléotides, caractérisé en ce que ladite surface (4) est la surface d'un matériau choisi parmi  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$  et un mélange comprenant au moins l'un de ces matériaux, ladite surface ayant subi un traitement pour la rendre hydrophile.
2. Support solide selon la revendication 1, caractérisé en ce que le matériau se présente sous la forme d'une couche (3) déposée sur un substrat (2).
3. Support solide selon la revendication 2, caractérisé en ce que la couche (3) possède une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et un micromètre.
4. Support solide selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que le substrat (2) est un substrat choisi parmi les substrats en verre, en plastique et en semiconducteur.
5. Support solide selon la revendication 4, caractérisé en ce que le substrat (2) est en silicium.
6. Support solide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit matériau est un mélange comprenant  $\text{SiO}_2$ .

7. Biopuce caractérisée en ce qu'elle comprend un support solide (1) pour l'immobilisation d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

5

8. Procédé de réalisation d'un support solide (1) présentant une surface (4) pour l'immobilisation d'oligonucléotides, le support (1) comprenant un substrat (2) supportant une couche (3) de  
10 matériau dont la face libre constitue ladite surface, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :  
- fourniture dudit substrat (2),  
- dépôt sur le substrat (2) d'une couche (3) d'un matériau choisi parmi  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$  et  
15 un mélange comprenant au moins l'un de ces matériaux,  
- traitement de la face libre de ladite couche (3) pour la rendre hydrophile.

9. Procédé selon la revendication 8,  
20 caractérisé en ce que l'étape de dépôt consiste à déposer une couche (3) de matériau d'une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et un micromètre.

10. Procédé selon la revendication 8,  
25 caractérisé en ce que l'étape de fourniture du substrat (2) consiste à fournir un substrat choisi parmi les substrats en verre, en plastique et en semiconducteur.

11. Procédé selon la revendication 8,  
30 caractérisé en ce que l'étape de dépôt consiste à déposer un matériau comprenant  $\text{SiO}_2$ .

12. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape de dépôt met en œuvre une méthode de dépôt choisie parmi l'évaporation sous vide, la pulvérisation par faisceau d'ions, la pulvérisation radio-fréquence, la pulvérisation magnétron, le dépôt en phase vapeur de couches atomiques (ALCVD) et le dépôt sol-gel.

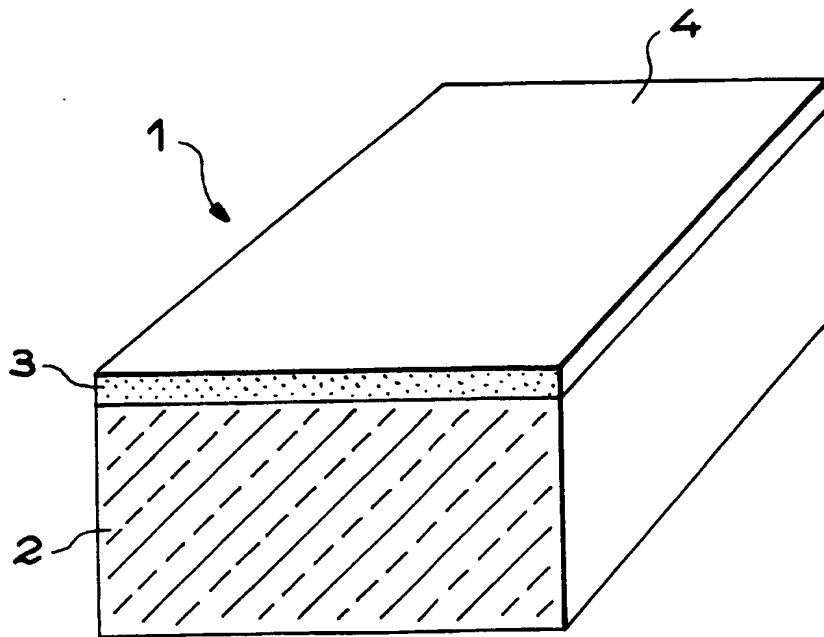
13. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape de traitement de la face libre de la couche (3) déposée consiste à nettoyer la couche par une solution basique ou par une solution acide.

14. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comporte une étape supplémentaire consistant à structurer la face libre de ladite couche (3).

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape de structuration met en œuvre une technique choisie parmi la gravure sèche, la gravure humide et le "lift-off".

25

1 / 1



établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 598047  
FR 0016314

<b>DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b>		<b>Revendication(s) concernée(s)</b>	<b>Classement attribué à l'invention par l'INPI</b>
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A,D	US 5 919 523 A (S.A. SUNDBERG ET AL.) 6 juillet 1999 (1999-07-06) * revendications 1-7; exemple 7 * -----	1-15	C12Q1/68 C04B35/495 C04B35/48 C04B35/46 C04B41/80
			<b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)</b>
			C04B C12Q B01J G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
31 août 2001		Hauck, H	

PO FORM 1503 12.88 (pdc14)

<b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b>  X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant
---	--